

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Local: JLacerda Lab, IMM; Clínica Universitária de Hematologia

Monitorização clínica e imunológica de doentes com Doença do Enxerto contra o Hospedeiro crónica após infusão de células T reguladoras

Aluna: Ana Bárbara Barroso de Matos, 12660

Orientadores:

Doutora Maria Godinho Soares

Professor Doutor João Forjaz de Lacerda

Ano Letivo 2015-2016

Índice

Índice de Figuras	3
Índice de Tabelas.....	4
Índice de Gráficos.....	5
Resumo.....	6
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	10
1. Seleção e caracterização dos doentes e respetivos dadores.....	10
2. Preparação do produto de infusão	12
3. Monitorização clínica	15
4. Monitorização imunológica.....	16
Protocolo de <i>Staining</i>	16
Resultados.....	18
1. Análise da pureza do produto infundido	18
2. Monitorização clínica	19
3. Reativação ou infeção <i>de novo</i> por CMV	21
4. Monitorização imunológica.....	21
Discussão.....	22
Agradecimentos	26
Bibliografia	27
Anexo 1.....	29
Anexo 2.....	32

Índice de Figuras

Figura 1 Representação do processo de depleção magnética	13
Figura 2 Representação do processo de seleção positiva	13
Figura 3 Representação esquemática do processo de purificação dos linfócitos T reguladores.....	14
Figura 4 Análise de citometria de fluxo para avaliação das purezas obtidas durante o processo de purificação de Tregs para infusão no doente 2	19
Figura 5 Manifestação cutânea da DECHc	20

Índice de Tabelas

Tabela 1 Caracterização dos dadores e doentes.....	11
Tabela 2 Pannel de citometria de fluxo para avaliação da pureza relativa ao protocolo de purificação	14
Tabela 3 Tubo de citometria de fluxo para monitorização imunológica e respetivos fluorocromos.....	18
Tabela 4 Pureza do produto relativa aos 3 doentes.....	18
Tabela 5 Monitorização clínica e farmacológica ao longo de 12 semanas relativos ao doente 3	20

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Mediana de percentagem de Tregs	21
Gráfico 2 Mediana de percentagem das subpopulações Treg “naive” e memoria	21

Resumo

Das principais complicações que ocorrem após transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas (TACEH), as infeções virais e a doença do enxerto contra o hospedeiro crónica (DECHc) encontram-se associadas a altas taxas de mortalidade e morbilidade ^[1]. Tirando partido da capacidade das células T reguladoras (Treg) de manter a tolerância periférica e suprimir respostas imunes, avalia-se com este trabalho a competência desta população infundida em doentes com DECHc de controlar a doença e possibilitar a diminuição da terapêutica imunossupressora.

Simultaneamente, a capacidade das Treg de suprimirem respostas imunes levanta a possibilidade de estas células infundidas não só suprimirem os mecanismos responsáveis pela DECH, mas também respostas protetoras, aumentando assim o risco de infeções, nomeadamente a reativação de Citomegalovírus (CMV). Neste sentido, no contexto de um ensaio clínico de fase I, foram avaliadas as sintomatologias associadas a DECHc, bem como a infeção por CMV pré e pós infusão de Treg.

Abstract

Viral infections (*de novo* or re-activation) and chronic *Graft Versus Host Disease* (cGVHD) are major complications associated to Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (alloHSCT). Such pathologies result in high rates of mortality and morbidity in the post-transplantation period ^[1]. Taking advantage of the ability of regulatory T cells (Treg) to maintain peripheral tolerance and suppress immune responses, this work evaluates the ability such cells to control cGVHD in patients with steroid-refractory disease.

While the suppressive capacity of Tregs may have the positive effect of reducing cGVHD, the possibility that the suppressive effect may hamper protective immune responses resulting in increased incidence of infection, such as CMV must be taken into consideration and carefully evaluated. Thus, in the context of a phase I clinical trial, cGVHD symptomatology and Cytomegalovirus (CMV) infection were evaluated pre and post Treg infusion in patients with steroid-refractory cGVHD.

Introdução

As infeções virais e a doença do enxerto contra o hospedeiro crónica (DECHc) são complicações que ocorrem frequentemente na sequência de transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas (TACEH), encontrando-se associadas a altas taxas de mortalidade e morbilidade ^[1]. A incidência aumentada de infeções virais está primariamente relacionada com a imunodeficiência no período pós-transplante bem como com as terapias imunossupressoras necessárias para o controle da DECHc. Esta patologia afeta cerca de 30-70% dos pacientes submetidos a TACEH ^[2]. É uma síndrome com uma apresentação clínica variável, assemelhando-se a outras patologias autoimunes, tal como esclerodermia, síndrome de Sjögren, cirrose biliar primária ou bronquiolite obliterante. As células T do dador presentes no enxerto exercem uma função importante na fisiopatologia da DECHc. Apesar da concreta etiologia deste processo permanecer incerta, pelo menos três mecanismos são sugeridos como possíveis causas para o aparecimento desta doença ^[3]:

1. Alterações na tolerância imunitária aos antígenos do doente (tolerância central) – é sugerido que os regimes de condicionamento pré transplante ou DECH aguda causem lesões epiteliais no timo que conduzem a uma desregulação nos mecanismos de tolerância central durante o período de reconstituição imunitária pós transplante. Assim, as novas células T CD4⁺ geradas pelo enxerto mediarão a evolução da doença. O balanço habitualmente bem regulado entre seleção negativa e positiva seria perdido e despoletaria um estado de auto-imunidade.
2. Diminuição do número de linfócitos Treg – uma possível diminuição do número de células Treg em circulação e a consequente falta de manutenção da tolerância periférica que lhe é atribuída poderiam explicar o aparecimento das lesões que caracterizam a DECH.
3. Ação mediada pelas células B – doentes com DECHc apresentam muitas vezes altos níveis de factor ativador de células B (BAFF - *B cell activating factor*), o que confere às suas células B ativadas uma maior resistência à apoptose. Os doentes frequentemente apresentam anticorpos circulantes auto-reativos, como é o caso de anticorpos dirigidos contra o receptor do factor de crescimento derivado das plaquetas ^[4], que podem contribuir para o aparecimento de fibrose nos tecidos.

Aquando da sua libertação do timo, as células T são designadas *naïve* (T_n). A resposta a antígenos resulta em proliferação e diferenciação desta população em células efectoras.

Estima-se que mais de 95% das células que expandem durante uma resposta imunitária morrem, enquanto uma pequena quantidade destas se transformam em células T de memória [5].

As células T_n expressam altos níveis de L-Selectina (CD62L), enquanto as células de memória se dividem em diferentes *subsets*, consoante sejam CD62L⁺ ou CD62L⁻ [6]. CD45RA e CD45R0 são proteínas de alto e baixo peso molecular, respetivamente, produzidas através de variantes de *splicing* do gene CD45, sendo que CD45R0 é preferencialmente expresso nas células T de memória.

As células T *central memory* (T_{CM}) são assim designadas devido ao seu potencial para serem recrutadas pelos tecidos linfoides secundários e são células CD62L⁺ CD45RA⁻.

As células T *effector memory* (T_{EM}) são assim designadas devido às suas funções efectoras *ex vivo* extremamente rápidas e ao seu potencial para serem recrutadas para os tecidos linfoides periféricos. Podemos identificá-las através da ausência de expressão de CD62L e CD45RA (CD62L⁻ CD45RA⁻).

Existe ainda uma outra população de memória denominada de *terminal effector* (T_{TE}), que apesar de não expressar CD62L, reexpressa CD45RA. Esta população é significativa nos linfócitos T CD8⁺, apresentando porém frequências muito baixas nos linfócitos T CD4⁺ em indivíduos saudáveis e jovens [5].

Além dos marcadores acima descritos, existem outras moléculas de superfície que são habitualmente utilizadas para identificar as populações T *naïve* e memória. Assim, as T_n expressam além de CD45RA e CD62L, o marcador CD28 (molécula de co-estimulação) e CCR7. Com a diferenciação para memória, estes marcadores alteram os seus níveis de expressão, de forma semelhante a CD62L. Neste trabalho optou-se por usar os marcadores CD45RA e CD62L para quantificar estas populações por citometria.

Os linfócitos T reguladores (Treg) constituem uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ com uma atividade preponderante na manutenção da tolerância periférica e na supressão de respostas imunes, estando amplamente descrito o seu papel fundamental no controlo da autoimunidade [6]. A identificação deste subtipo de linfócitos remonta ao ano de 1995,

altura em que Sakaguchi S. et al. [7] descrevem que esta população de linfócitos T CD4⁺ expressava constitutivamente grandes quantidades da cadeia alfa do recetor da interleucina (IL) 2 (CD25) e que tinha uma grande atividade supressora ao nível do sistema imunitário. Apesar deste reconhecimento do CD25 como um marcador de linfócitos Treg, a sua utilização no isolamento destas células é limitado, pois a ativação da célula T resulta num aumento da expressão deste marcador [8]. Assim, têm vindo a ser reconhecidos marcadores adicionais (intra e extracelulares) que permitem a sua identificação com maior rigor.

Neste estudo, além do CD25, foram ainda utilizados dois outros marcadores na identificação dos linfócitos Treg:

- Forkhead box P3 transcription factor (FoxP3) – trata-se de um marcador intracelular inicialmente identificado num ratinho mutante, portador de varias doenças auto-imunes que foram relacionadas com o defeito ao nível do gene do FoxP3 [9]. Em humanos, a perda de função do gene FoxP3 provoca dois síndromes auto-imunes potencialmente fatais - *X-linked autoimmunity and allergic dysregulation* (XLAAD) [10] e *Immune dysfunction, polyendocrinopathy, and enteropathy, X-linked* (IPEX) [11]. Sakaguchi et al. [5] demonstraram ainda que nem todas as células CD4⁺ derivadas do timo expressavam o marcador FoxP3. Apenas aquelas com fenótipo CD25^{bright} (expressão de CD25 em alta intensidade) expressavam o RNA mensageiro (RNAm) de FoxP3. Deste modo, FoxP3 demonstrou ser um factor crítico para a diferenciação dos linfócitos Treg, sendo fundamental na manutenção do fenótipo supressor que estas células apresentam. Constitui por este motivo um marcador importante na identificação dos linfócitos Treg.
- CD127 - é a cadeia alfa do receptor da IL-7 e representa um marcador de superfície importante na identificação dos linfócitos Treg. Seddiki et al. [12] demonstraram que os linfócitos Treg são altamente dependentes da expressão de IL-2 para a sua sobrevivência, porém são independentes e portanto expressam baixas quantidades do receptor da IL-7 (CD127^{low}). Assim, a baixa expressão de CD127 pelas células Treg, permite-nos utilizar este marcador de superfície na sua respectiva identificação e isolamento.

O trabalho que aqui se apresenta constitui a fase inicial de um ensaio clínico prospectivo de fase I em que esta população de células Treg é purificada a partir de uma nova colheita de produto de leucaferese proveniente do dador original e infundida em doentes com DECHc refratária a tratamento com corticosteroides.

Tem como principais objetivos avaliar:

- A toxicidade do produto
- A dose máxima tolerada pelos doentes
- A possível redução da sintomatologia associada à DECHc
- O eventual aparecimento de infeções e/ou reativação de CMV

Tendo em conta a função supressora das Treg, a sua infusão nesta população de doentes poderá influenciar positivamente a sintomatologia associada a DECHc (resultado que se espera alcançar), mas também, por outro lado, despoletar o aparecimento de episódios infecciosos, nomeadamente reativação de CMV, pelo que se avaliou também esta possibilidade ao longo deste trabalho.

Material e Métodos

Este trabalho relata apenas a informação recolhida acerca dos três primeiros doentes incluídos no ensaio clínico, apesar de estar contemplada a inclusão de cerca de 20 a 25 doentes, que receberão doses crescentes de linfócitos Treg. Foram recolhidos dados clínicos e imunológicos até à data de redação deste trabalho (até aos 6 meses pós infusão relativamente ao doente 1 e até às 12 semanas pós infusão relativamente aos doentes 2 e 3).

1. Seleção e caracterização dos doentes e respetivos dadores

Neste trabalho foram incluídos três doentes submetidos a TACEH, com DECHc refratária à terapêutica, apesar do uso de dois ou mais imunossuppressores. De acordo com o protocolo clínico, todos os doentes incluídos no ensaio encontravam-se sob uma dose estável de glucocorticoides quatro semanas antes da inclusão no estudo. Não foi definido um limite de idade para a inclusão no estudo, sendo que neste trabalho não constam doentes menores de idade. Apenas foram incluídos doentes com *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) *performance status* entre 0 e 2 e uma função de órgão adequada.

Quanto aos critérios de exclusão estes compreendiam os seguintes parâmetros:

- Doentes com necessidade de prednisolona (ou equivalente) superior a 1mg/kg/dia e/ou com necessidade concomitante de inibidores da calcineurina e sirolimus.
- Nova medicação imunossupressora ou infusão de linfócitos do dador nas quatro semanas ou cem dias anteriores, respetivamente, à infusão de Treg
- Recidiva da doença maligna
- Infecção ativa não controlada
- Seropositividade para HIV
- Infecção por Hepatite B ou C não controlada
- Gravidez

No ensaio clínico prevê-se a possibilidade de exclusão do doente em caso de:

- Impossibilidade de obtenção de leucaferese do dador original do transplante
- Insucesso no processo de purificação de Treg
- Toxicidade inaceitável (grau III ou IV) resultante da infusão
- Recidiva da doença maligna
- Agravamento da DECHc que exija um aumento da medicação imunossupressora
- Infecções virais ou fúngicas *de novo*

Na tabela 1 descrevem-se algumas características dos três doentes, no que diz respeito à doença neoplásica original, terapêuticas prévias ao transplante, tipo de enxerto, bem como especificidades relacionadas com a DECHc inicial. Discriminam-se ainda algumas características relativas aos dadores.

Tabela 1 Caracterização dos dadores e doentes

	Idade	Sexo	Diagnóstico	Intensidade do TACEH	ATG	Enxerto	Tipo dador	Sexo dador	Tempo DECHc	Nº órgãos afetados	Grau DECHc inicial
Doente 1	36	M	LMA	Reduzida	Sim	CESP	Familiar	F	41 meses	4	Grave
Doente 2	54	F	LMA	Reduzida	Sim	CESP	Familiar	M	16 meses	4	Grave
Doente 3	35	M	LMA	Reduzida	Sim	CESP	Não familiar	M	9 meses	2	Grave

M: Masculino; **F:** Feminino; **LMA:** Leucemia mieloide aguda; **ATG:** globulina anti timocítica; **CESP:** células estaminais do sangue periférico

2. Preparação do produto de infusão

Os linfócitos T CD4⁺ CD25⁺⁺ foram purificados recorrendo ao Sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec®), a partir do produto de leucaferese do dador original. O Sistema utiliza três componentes principais:

- Microesferas – são partículas magnéticas conjugadas com anticorpos monoclonais específicos contra os antígenos de interesse. Devido ao seu reduzido tamanho não necessitam de ser removidas do produto nas fases subsequentes do procedimento.
- Colunas – contêm uma matriz composta por esferas ferromagnéticas, cobertas por um material que não danifica as células. Quando são colocadas no separador magnético (ver adiante), as esferas amplificam o campo magnético cerca de 10000 vezes, induzindo assim um alto gradiente dentro da coluna. O espaço entre as esferas é suficiente para que as células passem livremente pela coluna. As células marcadas com as microesferas magnéticas são mantidas em suspensão dentro da coluna e não aderem à matriz da mesma. Esta suspensão minimiza o stress celular e diminui a formação de agregados.
- Separador – cria um campo magnético, produzindo, em conjunto com as colunas, um alto gradiente.

O produto de infusão foi purificado através de um protocolo de 2 passos (Figura 3):

1º - Depleção magnética de linfócitos B CD19⁺ e T CD8⁺ (Figura 1)

A depleção dos linfócitos T CD8⁺ e B CD19⁺ foi efetuada através de ligação seletiva dos antígenos CD8 e CD19 aos anticorpos monoclonais, que são acoplados a microesferas magnéticas. Após a incubação com os reagentes, as células marcadas ficam retidas na coluna, por separação magnética no aparelho CliniMACS (Miltenyi Biotec®), sendo removidas do produto de leucaferese. O produto não marcado (CD8⁻ e CD19⁻) é recolhido para subsequente purificação das células CD25⁺⁺.

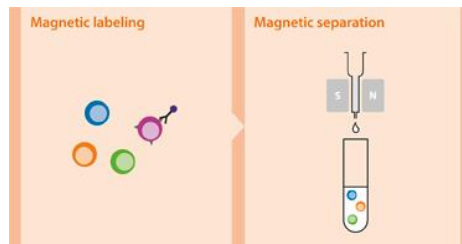


Figura 1 Representação do processo de depleção magnética ^[13]

Figura adaptada de www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/macstechnology/microbeads_dp.aspx

2º - Seleção positiva com anticorpo monoclonal anti-CD25 (Figura 2)

A fração negativa (células CD8⁻CD19⁻), proveniente do primeiro passo, é então incubada com as microesferas acopladas ao anticorpo anti-CD25. Este irá ligar-se às células CD25⁺⁺ que ficarão assim retidas na coluna do Sistema CliniMACS, sendo posteriormente recolhidas. As células não marcadas (CD25⁻) são removidas. O produto final, contendo células que expressam CD25⁺⁺, é coletado para ser posteriormente infundido.

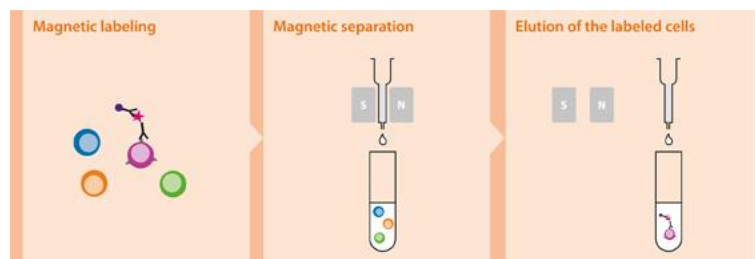


Figura 2 Representação do processo de seleção positiva ^[13]

Figura adaptada de www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/macstechnology/microbeads_dp.aspx

Este protocolo foi realizado no serviço de imunohemoterapia do HSM, em condições GMP (*Good manufacturing practices*). De acordo com o desenho do ensaio clínico, aos primeiros 5 doentes são infundidas $0,5 \times 10^6$ células/kg, pelo que este foi o número de células infundidas aos três doentes deste trabalho.

Posteriormente foi realizado o controlo de qualidade do produto (avaliação da pureza), recorrendo a citometria de fluxo. Na tabela 2 está representado o painel utilizado neste procedimento.

O “**Tubo 1**” permite uma avaliação da presença de populações que se pretendem eliminar neste procedimento (linfócitos B, T CD8+, *natural killer* e monócitos) pré e pós purificação, enquanto o “**Tubo 2**” permite, através de uma caracterização fenotípica detalhada das Treg, a avaliação do grau de pureza do produto obtido.

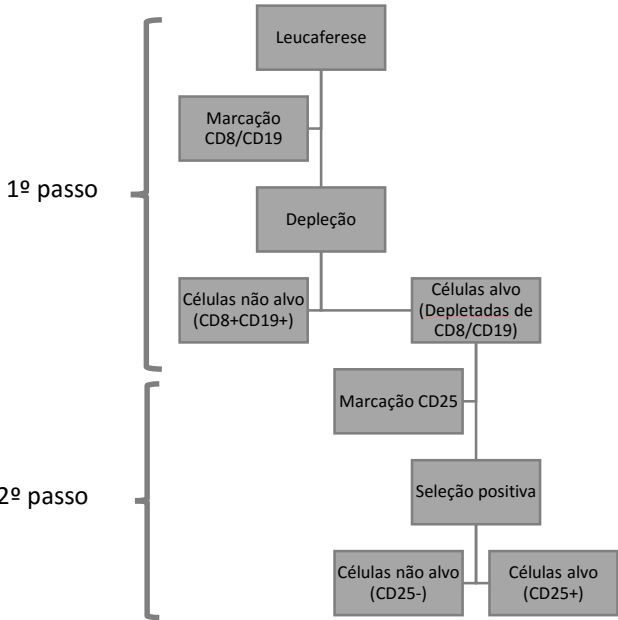


Figura 3 Representação esquemática do processo de purificação dos linfócitos T reguladores

Tabela 2 Painel de citometria de fluxo para avaliação da pureza relativa ao protocolo de purificação

Tubo 1		Tubo 2	
Fluorocromo	Marcador	Fluorocromo	Marcador
PE	CD8	FITC	CD45
PerCPCy5.5	CD3	PE	CD3
PE-Cy7	CD56	PerCPCy5.5	CD4
APC	CD4	APC	CD25
APCe780	CD20	APCe780	CD127
e450	CD14	e450	Foxp3
e506	CD45	e506	“Viability dye”

O tubo 1 consiste numa marcação de superfície enquanto o Tubo 2 inclui marcação intracelular para deteção de Foxp3

3. Monitorização clínica

Quanto ao diagnóstico e classificação da DECHc, a mais recente classificação, e que serviu de base à categorização dos doentes neste trabalho, determina que são os parâmetros clínicos que definem o estatuto agudo ou crónico da doença e não uma relação temporal relativamente ao transplante. Efetivamente, a classificação que a precedeu (2005) definia a presença de DECHc como o aparecimento de sintomas característicos de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa) 100 dias após o transplante, muitas vezes durante a descontinuação da terapêutica imunossupressora ^[14]. A antiga classificação dividia a DECHc em duas subcategorias:

- a) DECHc clássica sem características de DECHa;
- b) Um síndrome de sobreposição, com características de DECHc e DECHa.

Esta última subcategoria, que definia um síndrome de sobreposição, foi também clarificada na mais recente classificação, sendo referida como a presença de pelo menos uma manifestação de DECHa num paciente com o diagnóstico de DECHc. As manifestações de DECHa podem estar presentes aquando do diagnóstico de DECHc ou virem a desenvolver-se após o diagnóstico da doença crónica. Muitos pacientes diagnosticados com este síndrome de sobreposição ficam assintomáticos relativamente à doença aguda, enquanto a DECHc persiste. Por outro lado, pacientes apenas com DECHc podem desenvolver características da doença aguda quando a terapêutica imunossupressora é diminuída ^[2].

Os doentes foram classificados no que diz respeito ao grau de DECHc em todas as avaliações clínicas - score 0 (mínimo) a 3 (máximo) (Anexo 1).

Apresenta-se uma descrição adaptada dos parâmetros de classificação para os diversos órgãos e sistemas:

- ✓ Pele – percentagem de superfície corporal afetada por eritema ou rash maculopapular, líquen plano, lesões fibróticas, lesões papuloescamosas e queratose pilar, ulcerações, diminuição da mobilidade e rigidez.
- ✓ Boca – xerostomia, líquen plano ou outros sinais e sintomas, que interfiram com a alimentação.
- ✓ Olhos – xeroftalmia e a sua quantificação através da influência nas actividades da vida diária; necessidade de lubrificantes oculares.

- ✓ Aparelho gastrointestinal – presença de estenose esofágica, disfagia, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e a sua quantificação através da percentagem de peso corporal perdido.
- ✓ Fígado – elevação dos níveis de fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e bilirrubina total.
- ✓ Pulmões – dispneia, necessidade de oxigenoterapia e % FEV₁.
- ✓ Aparelho osteoarticular – rigidez, contraturas, eritema devida a fascíte e quantificação pelo grau de impacto nas actividades da vida diária.
- ✓ Aparelho genital – grau de dor ou desconforto ao exame genital.

Finalmente, após classificação de todos os órgãos ou sistemas foi calculado o grau global de DECHc, de leve a grave/severo, tendo em conta os seguintes critérios (Anexo 2):

- Leve – um ou dois órgãos envolvidos com grau 1 ou inferior e grau 0 nos pulmões;
- Moderado – três ou mais órgãos envolvidos com grau 1 ou inferior ou pelo menos um órgão (excepto pulmão) com grau 2 ou pulmão grau 2;
- Grave - pelo menos um órgão com grau 3 ou pulmão grau 2 ou 3.

Os doentes foram monitorizados no centro académico CHLN/FML, na Clínica Universitária de hematologia, com o apoio, em caso de necessidade, de uma equipa multidisciplinar, constituída por especialistas das seguintes áreas: Hematologia, dermatologia, estomatologia, oftalmologia, gastroenterologia, pneumologia, infecciologia, imagiologia, patologia clínica e ginecologia.

A monitorização incluiu o registo dos sinais, sintomas, bem como avaliação analítica, nomeadamente pesquisas repetidas de CMV por PCR.

4. Monitorização imunológica

A monitorização imunológica foi realizada às semanas 1 e 2 e aos meses 1,2,3,4,5,6,9 e 12 por citometria de fluxo.

Protocolo de *Staining*

Foram preparados dois tubos, um para marcação de superfície e outro para marcação intracelular. Em ambos foram colocados os anticorpos de superfície, aos quais se

adicionaram 200 µl de sangue, seguindo-se um período de incubação à temperatura ambiente.

- Tubo de marcação de superfície: Foi adicionado 2 ml de BD FACSLysing Solution, de forma a proceder à lise dos eritrócitos, sob condições hipotónicas, preservando as células linfocitárias. Procedeu-se a um período de incubação, uma lavagem por centrifugação com *phosphate buffered saline* (PBS) e fixação da solução com formaldeído a 2%. Após incubação com formaldeído, as células são lavadas por centrifugação em tampão fosfato-salino.

- Tubo de marcação intracelular: Após a marcação de superfície foi seguido o protocolo de marcação para Foxp3 da EbioScience®. Assim, foi adicionado 1ml eBioSciences Red Blood Cell Lysis Buffer (solução de lise eritrocitária à base de cloreto de amónia, com mínimos efeitos nas células linfocitárias), seguido de um período de incubação e lavagem por centrifugação com PBS.

A deteção de antigénios intracelulares requer uma permeabilização celular, para que os anticorpos consigam penetrar efetivamente na célula. As células foram então incubadas com a solução de permeabilização FOXP3 Fix/Perm Buffer (eBioScience®) e procedeu-se a uma lavagem final com PBS. Finalmente, adicionou-se ao tubo o anticorpo Foxp3 (eBioScience®), seguido de uma incubação e lavagem final com FSB.

As amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo (BD LSRFortessa) sempre no próprio dia.

Os dados foram analisados no *software* FlowJo (TreeStar Inc®) e refletem os resultados obtidos nos 3 primeiros doentes tratados no âmbito deste ensaio clínico, nos 3 primeiros meses.

Quanto à combinação de marcadores utilizados no reconhecimento dos diferentes subtipos celulares, as Treg foram identificadas e quantificadas pela co-expressão de CD3, CD4, Foxp3 e CD25 em alto nível (bright). Tal como descrito acima, a população T (CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺) *naive* foi identificada pela co-expressão de CD45RA e CD62L. As “*central memory*” foram identificadas pelo fenótipo CD45RA⁻CD62L⁺, as “*effector memory*” pelo fenótipo CD45RA⁻CD62L⁻, enquanto as células “*terminal effector*” foram identificadas pelo fenótipo CD45RA⁺CD62L⁻.

Os anticorpos e fluorocromos utilizados para quantificação de Treg e *subsets naïve* e memória CD4 e CD8 estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 Tubo de citometria de fluxo para monitorização imunológica e respetivos fluorocromos

PerCPCy5.5	PE-Cy7	APC	APCe780	e450	BV510
CD4	CD25	CD45RA	CD62L	Foxp3	CD3

Resultados

1. Análise da pureza do produto infundido

Os três produtos purificados no decurso deste trabalho apresentaram graus de pureza dentro dos critérios para infusão ($\geq 70\%$ células viáveis, $\geq 70\%$ células CD4⁺CD25⁺ e $\geq 50\%$ células CD4⁺CD25⁺CD127⁻). A percentagem de células CD4⁺CD25⁺ foi de 70,7%, 95,5% e 63,4% para os doentes 1, 2 e 3 respetivamente. Quanto às células contaminantes, nos 3 doentes registaram-se menos de 0.1% de células CD8⁺ e menos de 1% de células CD20⁺. Estes valores encontram-se discriminados na Tabela 4.

Na Figura 5 encontra-se um painel citometria de fluxo, relativo ao doente 2, para avaliação da pureza obtida durante o processo de purificação de Tregs.

Tabela 4 Pureza do produto relativa aos 3 doentes

	Produto leucaferese	Produto após depleção CD8/CD19	Produto após enriquecimento CD25 ⁺
Doente 1			
Total células viáveis	92,38×10 ⁸	40,5×10 ⁸	0,89×10 ⁸
CD3 ⁺	60,7%	64,4%	98,3%
CD8 ⁺	27,2%	1,28%	0,033%
CD20 ⁺	904%	0,12%	0,13%
CD4 ⁺ CD25 ⁺	4,2%	4,31%	70,7%
CD25 ⁺ CD127 ⁻	5,23%	6,15%	60,8%
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	0,32%	-----	49,7%
Doente 2			
Total células viáveis	276,6×10 ⁸	222,2×10 ⁸	1,31×10 ⁸
CD3 ⁺	73,4%	53,5%	96,8%
CD8 ⁺	20,1%	0,055%	0,069%
CD20 ⁺	11,5%	0,067%	0,27%
CD4 ⁺ CD25 ⁺	18,8%	23,1%	95,9%
CD25 ⁺ CD127 ⁻	10,8%	10,9%	93,6%
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	5,37%	5,93%	79,6%
Doente 3			
Total células viáveis	375,97×10 ⁸	34,18×10 ⁸	0,96×10 ⁸
CD3 ⁺	65,8%	94,9%	90%
CD8 ⁺	38,4%	0,97%	0,089%
CD20 ⁺	8,15%	0,04%	0,66%
CD4 ⁺ CD25 ⁺	3,8%	12,2%	63,4%
CD25 ⁺ CD127 ⁻	4,07%	8,07%	67,1%
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	0,35%	2,83%	23%

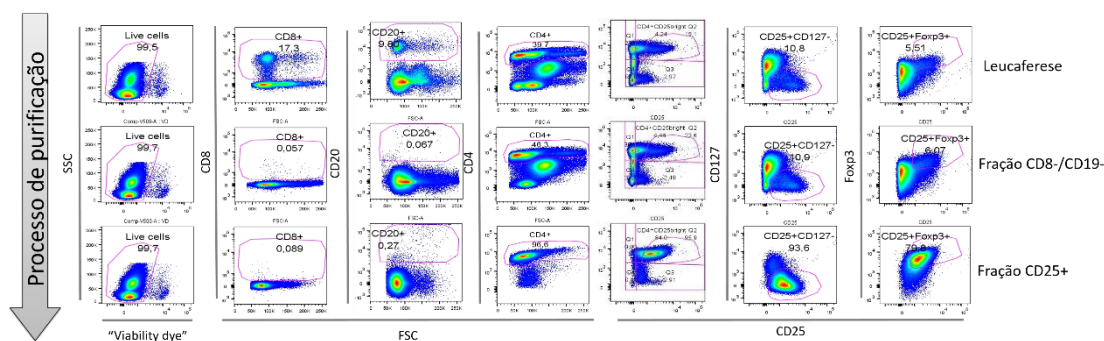


Figura 4 Análise de citometria de fluxo para avaliação das purezas obtidas durante o processo de purificação de Tregs para infusão no doente 2

2. Monitorização clínica

Até à presente data não foram registadas reações adversas em nenhum doente. Não se observaram igualmente infeções graves nos três doentes.

No que diz respeito à avaliação clínica e farmacológica, assistiu-se à redução no *score* de DECHc num dos doentes. Os outros dois mantiveram a classificação da primeira avaliação.

Discriminam-se os aspetos clínicos mais relevantes observados em cada doente ao longo dos sucessivos períodos de avaliação clínica.

O doente 1 manteve durante todas as avaliações clínicas grau 3 na pele, devido às características fibróticas extremamente marcadas, com diminuição da mobilidade articular, grau 2/3 na boca e olhos e grau 1 no aparelho gastrointestinal. Quanto à terapêutica imunossupressora, não sofreu grandes modificações (1g/dia de micofenolato de mofetil e 20mg/dia de prednisolona que, na 12ª semana foi alterada para 30 mg/dia). O doente foi classificado com um **score grave** de DECHc.

O doente 2 manteve a nível da pele as características fibróticas que lhe conferiram grau 3. Ao longo das avaliações conservou ainda grau 1 nos olhos, grau 2/3 ao nível do aparelho osteoarticular e grau 1/2 no aparelho genital. Quanto à terapêutica imunossupressora, também não sofreu grandes alterações ao longo dos 3 meses (250 mg/dia de micofenolato de mofetil com subida para 500 mg/dia à 12ª semana e 10mg/dia de prednisolona). O doente foi classificado com um **score grave** de DECHc.

Na figura 6 encontra-se representada uma imagem deste doente, onde é possível observar as lesões fibróticas nos membros inferiores.



Figura 5 Manifestação cutânea da DECHc

Lesões fibróticas, com diminuição da mobilidade nos membros inferiores (não visível na imagem).
Captação de imagem autorizada pelo doente

No doente 3 foi registada uma redução do seu *score* de severo/moderado para **moderado** na 12ª semana à custa da melhoria dos sinais e sintomas oftalmológicos. Isto possibilitou a redução da dose de micofenolato de mofetil para metade. Na tabela 5 apresenta-se a classificação de todos os órgãos e sistemas avaliados ao longo das 12 semanas, bem como informações relativas à terapêutica imunossupressora.

Tabela 5 Monitorização clínica e farmacológica ao longo de 12 semanas relativos ao doente 3

	Início	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 12
Pele	2	2	2	2	2	2	2	2
Boca	0	0	0	0	0	0	0	0
Olhos	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2
Ap. GI	0	0	0	0	0	0	0	0
Fígado	0	0	0	0	0	0	0	0
Pulmão	0	0	0	0	0	0	0	0
Fáscia/artic.	0	0	0	0	0	0	0	0
Genital	0	0	0	0	0	0	0	0
Score Global	M/S	M/S	M/S	M/S	M/S	M/S	M/S	M
MMF	1g/dia	1g/dia	1g/dia	1g/dia	1g/dia	1g/dia	1g/dia	0,5g/dia
Prednisolona	15mg/d	15mg/d	15mg/d	15mg/d	15mg/d	15mg/d	15mg/d	15mg/d

Sem: semana; **MMF:** micofenolato de mofetil; **M/S:** moderado/severo; **M:** moderado

3. Reativação ou infecção *de novo* por CMV

Não se observaram reativações a CMV em nenhum dos doentes sujeitos a terapia celular com Treg.

4. Monitorização imunológica

Nos gráficos 1 e 2 representam-se os resultados da monitorização imunológica relativa aos três doentes, nos primeiros três meses. Não foram observadas diferenças aparentes nas percentagens de Treg, sendo que a população manteve-se estável em todos os doentes durante os três primeiros meses. Verificou-se a mesma estabilidade nas subpopulações Treg *naïve* e memória.

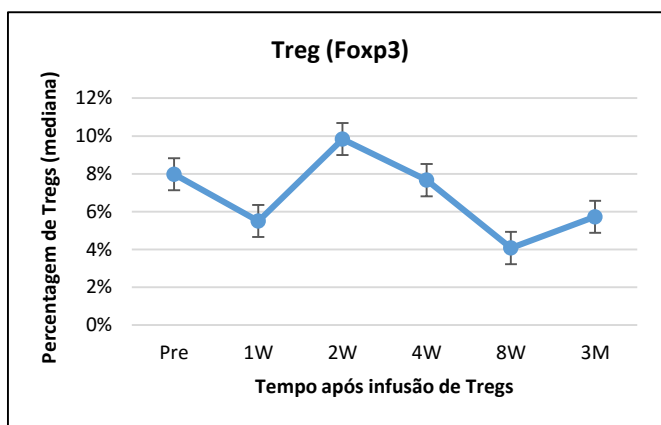


Gráfico 1 Mediana de percentagem de Tregs

Identificadas pela expressão de Foxp3, no momento pré-infusão e às semanas 1, 2, 3, 4, bem como mês 2 e 3, relativos aos 3 primeiros doentes.

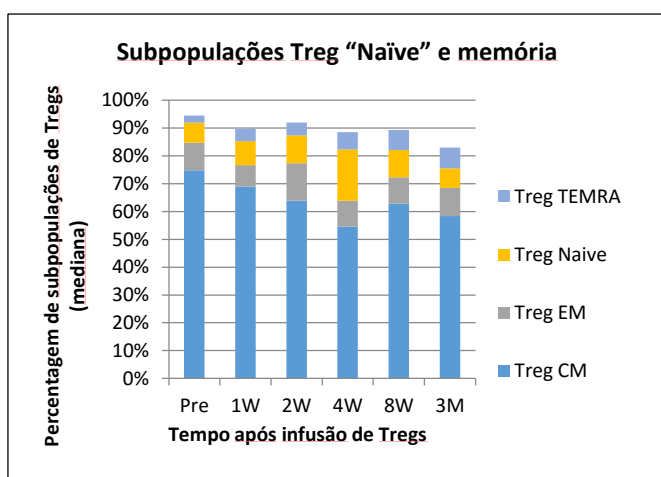


Gráfico 2 Mediana de percentagem das subpopulações Treg “naïve” e memória

Pré-infusão e às semanas 1, 2, 3, 4, bem como nos meses 2 e 3. Os dados representados são relativos aos 3 primeiros doentes.

TEMRA: “Effector memory” RA positivo;

EM: “Effector memory”;

CM: “Central memory”.

Discussão

O potencial imunossupressor das Tregs e o seu impacto positivo nos doentes com DECHc após TACEH é um assunto que tem despertado cada vez mais o interesse da comunidade científica, pois se por um lado a mortalidade precoce relacionada com o transplante tem sido cada vez mais reduzida devido ao impacto positivo dos regimes de condicionamento de baixa intensidade e terapêuticas contra agentes infecciosos mais eficazes, por outro lado, não têm havido grandes avanços na diminuição da mortalidade e morbilidade tardias^[15]. Este último ponto relaciona-se principalmente com a falta de terapias verdadeiramente eficazes contra a DECHc. Num estudo envolvendo 85 doentes a taxa de sobrevivência a 10 anos foi de apenas 42% ^[16].

O objetivo principal deste ensaio clínico de fase I foi atingido. Tratava-se de avaliar a segurança/ausência de toxicidade do produto infundido. Nesta fase inicial, no que diz respeito à avaliação clínica, não foram detetados eventos adversos, tais como infeções graves, nomeadamente reativação de CMV.

Apesar de os resultados desta fase serem bastante encorajadores, nesta dose estudada de Treg, não se verificaram alterações na homeostasia desta população. Tal como protocolado, será interessante avaliar se a infusão de um maior número destas células resultará em aumento do número de Tregs em circulação ou alteração do seu fenótipo, e a sua possível associação com melhoria clínica. Até à data de redação desta tese foram incluídos no estudo mais dois novos doentes. Na espectável continuação de ausência de toxicidade e eventos adversos, será possível, com segurança, progredir para as doses de Treg preconizadas no ensaio (1×10^6 e $2-3 \times 10^6$ células/Kg).

Tendo em conta que o número de Treg que é viável obter diretamente a partir do processo de leucaferese é limitado, admite-se a possibilidade de ser necessária a sua expansão. Existem várias técnicas descritas para a expansão desta população celular, das quais se descrevem dois trabalhos que utilizam estratégias de expansão *in vitro* e um de expansão *in vivo*.

Simrit Parmar, et al ^[17], descrevem uma abordagem para expansão de Tregs, que consiste na utilização de células criopreservadas do cordão umbilical. Os linfócitos CD25⁺⁺ são

purificados recorrendo ao sistema CliniMACS, sendo que a fração positiva é então cultivada num meio contendo anticorpo anti-CD3/CD28, acoplado a esferas magnéticas, e são depois adicionados 200IU/ml de IL-2, concentração esta que é mantida estável por sucessivos ajustes ao longo do processo. A contagem inicial de Tregs era 1×10^6 células/ml, tendo-se obtido uma expansão celular ao 14º dia de cultura para 3×10^8 células.

Outra técnica foi descrita por Hao Guo, et al ^[18]. Células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC) acopladas a anticorpo monoclonal anti-CD3 foram cultivadas juntamente com células Treg num ratio 1:1, IL-2 recombinante e 100 ng/ml de rapamicina (para evitar a contaminação por células não Treg). As células passaram por várias rondas de suplementação do meio com IL-2, sem que lhes fosse adicionada rapamicina novamente. Após 3 rondas de expansão (22-24 dias) as Treg sofreram uma expansão na ordem de 1000x. No final do protocolo de expansão algumas células foram criopreservadas e posteriormente sofreram mais uma ronda de expansão, onde se observou uma incidência de apoptose celular semelhante à do produto antes da criopreservação. Este grupo provou assim, também, que a estimulação de células criopreservadas consegue ultrapassar os efeitos nefastos da criopreservação na viabilidade das células.

Ken-ichi Matsuoka et al. ^[19] descreveram uma técnica que consistia na expansão *in vivo* das células Treg. Protocolaram um ensaio clínico que compreendia a administração de IL-2 exógena a doentes com DECHc durante um período de 8 semanas. Verificaram então uma série de alterações na homeostasia das Tregs, nomeadamente aumento da proliferação, e resistência à apoptose. Cerca de 50% dos pacientes obtiveram melhoria clínica durante o período em que decorreu o estudo, sem que fosse relatado progressão da doença. Porém, a IL-2 exógena tem uma semi-vida curta *in vivo*, o que surge como uma limitação à manutenção de níveis elevados de citocinas sistémicas, verificando-se um retorno da proliferação das Tregs a níveis basais aquando da diminuição da concentração sistémica de IL-2. Os autores sugerem que eventualmente seria necessária uma terapia a longo prazo, para que a tolerância periférica induzida pelos linfócitos Treg perdurasse e induzisse uma maior e mais prolongada taxa de remissão da DECHc.

Os linfócitos Treg, além de serem utilizados no tratamento da DECH, têm sido também aplicados noutras patologias com comprovado componente imunológico. É o caso da diabetes tipo I e da Doença de Crohn.

Um recente ensaio clínico de fase 1, consistiu na administração a catorze doentes adultos, portadores de diabetes tipo I, de células Treg expandidas *ex vivo*, em quatro doses escaladas (quatro coortes) ^[20]. As células Treg foram purificadas e colocadas em cultura juntamente com anticorpo anti-CD3/CD28, acoplado a esferas magnéticas e IL-2 recombinante (técnica já citada de Simrit Parmar, et al ^[17]). As alterações na função metabólica foram avaliadas recorrendo ao péptido-C. Nos coortes 1 e 2 (que receberam as doses mais baixas de Tregs) o péptido-C manteve-se inalterado após dois anos de monitorização. Quatro doentes do coorte 3 e quatro doentes do coorte 4 demonstraram uma diminuição para metade do péptido-C às 78 semanas de monitorização. Porém, os autores não consideraram estes resultados significativos, devido ao número limitado de doentes e tendo em conta que a redução dos níveis de péptido-C poderiam estar de acordo com a história natural da doença. De qualquer forma, os resultados são encorajadores no que diz respeito à segurança do produto de infusão e poderão servir de base para estudos posteriores.

Outro exemplo onde as Treg foram igualmente aplicadas é o caso da Doença de Crohn (DC) ^[21]. Canavan J.B., et al isolaram dois *subsets* de células Treg a partir de células do sangue periférico de treze doentes com DC ($CD4^+CD25^{++}CD127^-CD45RA^+$ e $CD4^+CD25^{++}CD127^-CD45RA^-$). Seguidamente, as células passaram por um processo de expansão *in vitro* utilizando meio de cultura contendo IL-2, rapamicina e anticorpo anti-CD3/CD28 acoplados a microesferas. Foi avaliado ainda durante o processo de expansão *in vitro* o potencial das células que pertenciam a cada *subset*, para induzirem um estado inflamatório, nomeadamente através da deteção de secreção de IL-17 (envolvida na patogénese das doenças inflamatórias intestinais ^[22]). A expressão desta interleucina estava abaixo do limite de deteção no *subset* RA^+ e significativamente aumentada no *subset* RA^- . O subset de células Treg RA^+ foi infundido em ratinhos que haviam recebido um xenotransplante de intestino delgado humano, nos quais foi introduzida *E. coli* de forma a provocar uma inflamação da mucosa. Os investigadores conseguiram ainda provar a existência (“*homing*”) das células Treg RA^+ infundidas ao nível do intestino

inflamado, através de recolha de células da mucosa do intestino delgado e recorrendo a técnicas de imunofluorescência.

A grande variedade de estratégias que têm vindo a ser estudadas, bem como o potencial dos linfócitos Treg noutras patologias só reforçam a importância deste estudo, que pretende assumir-se como uma nova ferramenta no tratamento de doentes com DECHc.

O trabalho que se realizou constitui apenas o primeiro passo daquele que se espera ser um projeto com relevância no tratamento da DECHc. Espera-se, assim, com este ensaio clínico vir a alcançar bases sólidas suficientes para instituir nos doentes afetados com DECHc uma terapêutica segura e eficaz, baseada na infusão de Tregs.

Contudo, considero que os resultados obtidos até à data são bastante encorajadores e constituem um ponto de partida seguro para as fases subseqüentes do estudo.

Agradecimentos

A realização desta Tese de Mestrado contou com vários apoios e incentivos, sem os quais a sua realização não seria possível.

À Doutora Maria Godinho Soares, pela paciência em ensinar a uma inexperiente aluna de Medicina todos os processos laboratoriais que constam neste trabalho. Pelo acompanhamento diário no laboratório, pela disponibilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas, que por vezes foram tão óbvias, mas cruciais para o entendimento dos diversos mecanismos imunológicos. Pela amizade demonstrada a cada dia. Sem ela certamente nada disto seria possível.

Ao Professor Doutor João Forjaz de Lacerda, que suscitou o meu entusiasmo pela Hematologia durante as suas aulas, e que me recebeu no seu laboratório e no seu projeto, estando sempre bastante disponível para me ajudar em qualquer dificuldade.

A todos os colaboradores do Lacerda Lab. – IMM, que me acompanharam nesta jornada e ajudaram no crescimento do saber.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e ao programa GAPIC, que através do seu financiamento e incentivo à investigação constituíram um motor ao desenvolvimento deste trabalho.

À minha família e amigos, pela paciência que demonstraram ao longo destes meses e pelo apoio nos momentos mais difíceis. Por serem bons companheiros e principalmente bons ouvintes. Sem eles o meu percurso seria bem mais atribulado.

Bibliografia

- [1] Scheidawind, D. et al; Regulatory T cells and natural killer T cells for modulation of GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation; *Blood*, 2013; 122: 3116-3121
- [2] Jagasia, M. H. et al; National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in Chronic Graft-versus-Host Disease; *ASBMT*, 2015. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Mar;21(3):389-401
- [3] Chang-Ki Min. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease: the unveiling of an enigma. *Korean J Hematol*. 2011 Jun; 46(2): 80–87
- [4] Svegliati S, Olivieri A, Campelli N, Luchetti M, Poloni A, Trappolini S, Moroncini G, Bacigalupo A, Leoni P, Avvedimento EV, Gabrielli A.. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):237-41.
- [5] Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2013 Nov;43(11):2797-809.
- [6] Corthay, A.. How do regulatory T cells work?; *Scandinavian Journal of Immunology*, 2009; 70: 326-336
- [7] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M.. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
- [8] Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY.. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-64.
- [9] Nizar S, Meyer B, Galustian C, Kumar D, Dalglish A.. T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1806(1):7-17.
- [10] Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM.. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(12):R75-81.
- [11] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD.. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):20-1.

- [12] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B.. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1693-700.
- [13] MACS MILTENYIBIOTEC. Separation Strategies. Disponível em http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/macs-technology/microbeads_dp.aspx [Consultado em 31-01-2016]
- [14] Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al; National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005 Dec;11(12):945-56.
- [15] Gérard Socié; Jerome Ritz; Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 2014; 124 (3)
- [16] John R. Wingard, et al; Predictors of Death From Chronic Graft-Versus-Host disease after Bone Marrow Transplantation. *Blood*, Vol 74, No 4 (September), 1989: pp 1428-1435
- [17] Simrit Parmar, et al; Third Party Umbilical Cord Blood-Derived Regulatory T cells Prevent Xenogenic Graft-versus-Host Disease; *Cytotherapy*. 2014 Jan; 16(1): 90–100.
- [18] Guoa H., Zhanga H., Lua L., Ezzelaraba M. B., Thomson A. W.. Generation, cryopreservation, function and in vivo persistence of ex vivo expanded cynomolgus monkey regulatory T cells. *Cellular Immunology*. 2015 Feb. 19-28
- [19] Matsuoka K, et al. Low-dose interleukin 2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2013 Apr 3;5(179):179ra43
- [20] Jeffrey A. Bluestone, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine*. Nov 2015. Vol 7 Issue 315 315ra189
- [21] Canavan J.B., et al. Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*. Feb 2015; 0:1–11
- [22] Hovhannisyan Z., Treatman J., Littman D. R. and Mayer L.. Characterization of IL-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 Mar; 140(3): 957–965.

Anexo 1

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
PERFORMANCE SCORE: [] KPS ECOG LPS	<input type="checkbox"/> Asymptomatic and fully active (ECOG 0; KPS or LPS 100%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, fully ambulatory, restricted only in physically strenuous activity (ECOG 1, KPS or LPS 80-90%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, ambulatory, capable of self-care, >50% of waking hours out of bed (ECOG 2, KPS or LPS 60-70%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, limited self-care, >50% of waking hours in bed (ECOG 3-4, KPS or LPS <60%)
SKIN† [] SCORE % BSA	<input type="checkbox"/> No BSA involved	<input type="checkbox"/> 1-18% BSA	<input type="checkbox"/> 19-50% BSA	<input type="checkbox"/> >50% BSA
<i>GVHD features to be scored by BSA:</i>				
Check all that apply:				
<input type="checkbox"/> Maculopapular rash/erythema <input type="checkbox"/> Lichen planus-like features <input type="checkbox"/> Sclerotic features <input type="checkbox"/> Papulosquamous lesions or ichthyosis <input type="checkbox"/> Keratosis pilaris-like GVHD				
SKIN FEATURES SCORE:	<input type="checkbox"/> No sclerotic features	<input type="checkbox"/> Superficial sclerotic features "not hidebound" (able to pinch)	Check all that apply:	
			<input type="checkbox"/> Deep sclerotic features <input type="checkbox"/> "Hidebound" (unable to pinch) <input type="checkbox"/> Impaired mobility <input type="checkbox"/> Ulceration	
<i>Other skin GVHD features (NOT scored by BSA)</i>				
Check all that apply:				
<input type="checkbox"/> Hyperpigmentation <input type="checkbox"/> Hypopigmentation <input type="checkbox"/> Poikiloderma <input type="checkbox"/> Severe or generalized pruritus <input type="checkbox"/> Hair involvement <input type="checkbox"/> Nail involvement <input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):				
MOUTH <i>Lichen planus-like features present:</i>	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild symptoms with disease signs but not limiting oral intake significantly	<input type="checkbox"/> Moderate symptoms with disease signs with partial limitation of oral intake	<input type="checkbox"/> Severe symptoms with disease signs on examination with major limitation of oral intake
<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):				

(cont.)

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
EYES	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requirement of lubricant eye drops ≤ 3 x per day)	<input type="checkbox"/> Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring lubricant eye drops > 3 x per day or punctal plugs), WITHOUT new vision impairment due to KCS	<input type="checkbox"/> Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) OR unable to work because of ocular symptoms OR loss of vision due to KCS
<i>Keratoconjunctivitis sicca (KCS) confirmed by ophthalmologist:</i>	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Not examined			
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):				
GI Tract	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Symptoms without significant weight loss* ($<5\%$)	<input type="checkbox"/> Symptoms associated with mild to moderate weight loss* (5-15%) OR moderate diarrhea without significant interference with daily living	<input type="checkbox"/> Symptoms associated with significant weight loss* $>15\%$, requires nutritional supplement for most calorie needs OR esophageal dilation OR severe diarrhea with significant interference with daily living
Check all that apply:				
<input type="checkbox"/> Esophageal web/proximal stricture or ring				
<input type="checkbox"/> Dysphagia				
<input type="checkbox"/> Anorexia				
<input type="checkbox"/> Nausea				
<input type="checkbox"/> Vomiting				
<input type="checkbox"/> Diarrhea				
<input type="checkbox"/> Weight loss $\geq 5\%$ *				
<input type="checkbox"/> Failure to thrive				
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):				
LIVER	<input type="checkbox"/> Normal total bilirubin and ALT or AP < 3 x ULN	<input type="checkbox"/> Normal total bilirubin with ALT ≥ 3 to 5 x ULN or AP ≥ 3 x ULN	<input type="checkbox"/> Elevated total bilirubin but ≤ 3 mg/dL or ALT > 5 ULN	<input type="checkbox"/> Elevated total bilirubin > 3 mg/dL
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):				
LUNGS**				
Symptom score:	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild symptoms (shortness of breath after climbing one flight of steps)	<input type="checkbox"/> Moderate symptoms (shortness of breath after walking on flat ground)	<input type="checkbox"/> Severe symptoms (shortness of breath at rest; requiring O_2)
Lung score:				
% FEV1 <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> FEV1 $\geq 80\%$	<input type="checkbox"/> FEV1 60-79%	<input type="checkbox"/> FEV1 40-59%	<input type="checkbox"/> FEV1 $\leq 39\%$
<i>Pulmonary function tests</i>				
<input type="checkbox"/> Not performed				
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):				

(cont.)

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3			
JOINTS AND FASCIA	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild tightness of arms or legs, normal or mild decreased range of motion (ROM) AND not affecting ADL	<input type="checkbox"/> Tightness of arms or legs OR joint contractures, erythema thought due to fasciitis, moderate decrease ROM AND mild to moderate limitation of ADL	<input type="checkbox"/> Contractures WITH significant decrease of ROM AND significant limitation of ADL (unable to tie shoes, button shirts, dress self etc.)			
P-ROM score (see below)							
Shoulder (1-7): _____							
Elbow (1-7): _____							
Wrist/finger (1-7): _____							
Ankle (1-4): _____							
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____							
GENITAL TRACT (See Supplemental figure [‡])	<input type="checkbox"/> No signs	<input type="checkbox"/> Mild signs [‡] and females with or without discomfort on exam	<input type="checkbox"/> Moderate signs [‡] and may have symptoms with discomfort on exam	<input type="checkbox"/> Severe signs [‡] with or without symptoms			
<input type="checkbox"/> Not examined							
Currently sexually active							
<input type="checkbox"/> Yes							
<input type="checkbox"/> No							
<input type="checkbox"/> Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____							
Other indicators, clinical features or complications related to chronic GVHD (check all that apply and assign a score to severity (0-3) based on functional impact where applicable none – 0, mild -1, moderate -2, severe – 3)							
<input type="checkbox"/> Ascites (serositis) _____	<input type="checkbox"/> Myasthenia Gravis _____						
<input type="checkbox"/> Pericardial Effusion _____	<input type="checkbox"/> Peripheral Neuropathy _____	<input type="checkbox"/> Eosinophilia > 500/μl _____					
<input type="checkbox"/> Pleural Effusion(s) _____	<input type="checkbox"/> Polymyositis _____	<input type="checkbox"/> Platelets <100,000/μl _____					
<input type="checkbox"/> Nephrotic syndrome _____	<input type="checkbox"/> Weight loss >5%* without GI symptoms _____	<input type="checkbox"/> Others (specify): _____					
Overall GVHD Severity (Opinion of the evaluator)							
<input type="checkbox"/> No GVHD <input type="checkbox"/> Mild <input type="checkbox"/> Moderate <input type="checkbox"/> Severe							
Photographic Range of Motion (P-ROM)							
	1 (Worst)	2	3	4	5	6	7 (Normal)
Shoulder							
Elbow							
Wrist/finger							
Ankle							

Organ scoring of chronic GVHD. ECOG indicates Eastern Cooperative Oncology Group; KPS, Karnofsky Performance Status; LPS, Lansky Performance Status; BSA, body surface area; ADL, activities of daily living; LFTs, liver function tests; AP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; ULN, normal upper limit. *Weight loss within 3 months. [‡]Skin scoring should use both percentage of BSA involved by disease signs and the cutaneous features scales. When a discrepancy exists between the percentage of total body surface (BSA) score and the skin feature score, OR if superficial sclerotic features are present (Score 2), but there is impaired mobility or ulceration (Score 3), the higher level should be used for the final skin scoring. [‡]To be completed by specialist or trained medical providers (see Supplemental Figure). **Lung scoring should be performed using both the symptoms and FEV1 scores whenever possible. FEV1 should be used in the final lung scoring where there is discrepancy between symptoms and FEV1 scores.

Biology of Blood and Marrow Transplant 2015 21, 389-401

Anexo 2

NIH Global Severity of chronic GVHD

Mild chronic GVHD

1 or 2 Organs involved with no more than score 1 *plus*

Lung score 0

Moderate chronic GVHD

3 or More organs involved with no more than score 1

OR

At least 1 organ (not lung) with a score of 2

OR

Lung score 1

Severe chronic GVHD

At least 1 organ with a score of 3

OR

Lung score of 2 or 3

Key points:

In skin: higher of the 2 scores to be used for calculating global severity.

In lung: FEV1 is used instead of clinical score for calculating global severity.

If the entire abnormality in an organ is noted to be unequivocally explained by a non-GVHD documented cause, that organ is not included for calculation of the global severity.

If the abnormality in an organ is attributed to multifactorial causes (GVHD plus other causes) the scored organ will be used for calculation of the global severity regardless of the contributing causes (no downgrading of organ severity score).

Biology of Blood and Marrow Transplant 2015 21, 389-401